INERIS

références

CONCILIER
PROTECTION ANIMALE
ET AMÉLIORATION
DE LA PRÉDICTION
DÉCEMBRE 2013

les méthodes alternatives en expérimentation animale

INERIS
maîtriser le risque
pour un développement durable

SOMMAIRE

INERIS RÉFÉRENCES
LES MÉTHODES ALTERNATIVES EN EXPÉRIMENTATION ANIMALE

02 ◆ RÉSUMÉ NON TECHNIQUE
Concilier protection animale et amélioration de la prédiction

04 ◆ INTRODUCTION
Un défi à relever

06 ◆ DE QUOI PARLE-T-ON ?
Les méthodes alternatives

08 ◆ CONTEXTE
Remplacer, Réduire, Raffiner l'expérimentation animale

12 ◆ LES ATTENTES SOCIÉTALES
Une opinion structurée en 3 groupes

14 ◆ LA RECHERCHE À L'INERIS
Les axes de recherche
Feuille de route 2013-2020
Quelques publications récentes

22 ◆ PRÉCONISATIONS DE LA CORE

23 ◆ CONCLUSION
Les méthodes alternatives reçoivent un accueil positif mais lucide

25 ◆ ANNEXES
Annexe 1 : Les réseaux et la recherche
Annexe 2 : Analyse simplifiée des avancées et des enjeux
Annexe 3 : Liens utiles

L'INERIS, acteur de la toxicologie prédictive, travaille depuis plusieurs années sur les méthodes alternatives en expérimentation animale. Le recours à ces méthodes, exigence éthique, est aussi une nécessité pratique dans un contexte réglementaire qui les préconise et, au-delà, dans un contexte de recherche socialement responsable y compris en accompagnement à l'innovation.

Dans le cadre de sa stratégie d'ouverture à la société, l'Institut a par ailleurs engagé des actions visant à renforcer son dialogue avec la société civile organisée sur des sujets qui représentent des enjeux sociétaux. S'agissant des méthodes alternatives en expérimentation animale, l'INERIS a ainsi coordonné un projet de recherche « PICASO Alternatives » sur la « Place des méthodes alternatives en expérimentation animale dans le domaine santé-environnement : prise en compte des attentes sociétales » (2011-2013). Le Programme REPERE du Ministère en charge de l'Écologie, qui finance le projet, explore les voies de la participation de la société civile organisée au pilotage de la recherche et de l'expertise. PICASO Alternatives a été piloté en partenariat avec Écologie Sans Frontière (ESF), l'Association Nationale de Défense des Consommateurs et Usagers (CLCV) et la Coordination Nationale Médicale Santé Environnement (CNMSE), sous l'égide d'un tiers-veilleur sociologue. La partie sociétale du présent dossier de référence consiste en une synthèse issue de ce projet de recherche. En effet, la question des méthodes alternatives en expérimentation animale n'est pas uniquement scientifique et technique. C'est tout l'intérêt d'une collaboration sciences-société telle qu'elle a été définie dès l'origine et mise en œuvre dans le projet PICASO Alternatives. Afin d'identifier les attentes sociétales, quatre outils ont été utilisés : des groupes de discussion, un groupe Facebook, un questionnaire aux lanceurs d'alerte et un questionnaire grand public (2361 répondants). Le panorama tiré des différents questionnements fait apparaître dans l'échantillon trois groupes de populations : les scientifiques, les militants et les personnes n'appartenant à aucune association. On peut ainsi voir se dessiner les populations entre lesquelles il serait possible d'établir dès maintenant le dialogue.

Bien que l'expérimentation animale occupe encore aujourd'hui une place centrale pour évaluer la toxicité des substances, les études toxicologiques ont néanmoins

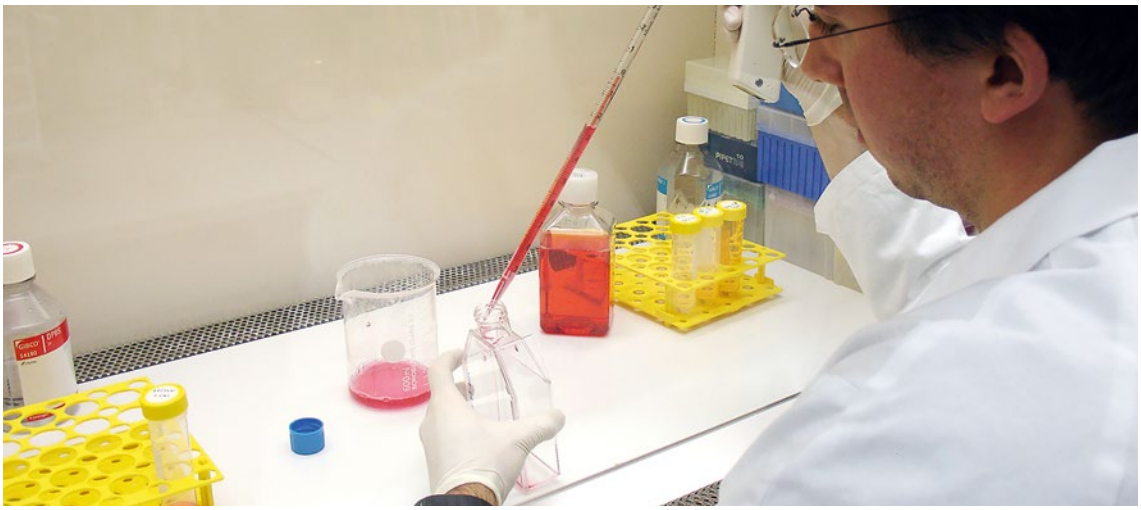
« IL RESSORT DE L'ENQUÊTE PICASO ALTERNATIVES QU'UNE MAJORITÉ DES RÉPONDANTS CONSIDÈRE QU'IL EST ENCORE TROP TÔT POUR SE PASSER TOTALEMENT DE L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE. CEPENDANT, LES PRÉOCCUPATIONS SUR LA SOUFFRANCE ANIMALE ET SUR LA SÉCURITÉ D'UTILISATION DES SUBSTANCES CHIMIQUES SONT TRÈS PRÉSENTES ET PARTAGÉES »

tendance, avec la double évolution du corpus réglementaire (bien-être animal, substances chimiques), à laisser une plus large place aux méthodes alternatives. L'INERIS développe ou évalue des méthodes alternatives en vue de la mise en œuvre de stratégies de tests intégrés permettant de remplacer, réduire ou raffiner, selon les principes exprimés par la règle des « 3R », le recours à l'expérimentation animale, principalement dans le domaine de l'évaluation de la sécurité des produits chimiques. Si le développement de l'(éco-)toxicologie prédictive est une priorité de l'INERIS, l'Institut joue aussi un rôle dans la reconnaissance de ces méthodes, tout d'abord avec la validation du concept par les chercheurs. Mais, face au besoin croissant en méthodes alternatives, l'Institut va plus loin : compte-tenu du temps nécessaire à la validation réglementaire et du besoin à utiliser en confiance ces méthodes dans d'autres contextes, l'INERIS réfléchit à la mise en place d'un processus de pré-validation afin de faciliter la valorisation de la recherche dans ce domaine. Ce processus doit accompagner le passage de la R&D à la normalisation ou à la validation réglementaire. C'est aussi le seul institut français respectant les bonnes pratiques de laboratoire qui a rejoint le 3 juillet 2013 le réseau européen des laboratoires pour la validation des méthodes alternatives coordonné par le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM).

Les méthodes alternatives en expérimentation animale reposent principalement sur des méthodes de remplacement *in vitro* (modèles cellulaires) ou *in silico* (modèles mathématiques). Il existe aussi des méthodes de réduction, en particulier l'optimisation des protocoles *in vivo* et les méthodes statistiques, et des méthodes de raffinement comme l'imagerie du petit animal *in vivo*. Les méthodes alternatives sont le plus souvent recommandées dans des approches intégratives combinant l'ensemble des outils disponibles afin de n'utiliser l'animal qu'en dernier recours. Les défis de la feuille de route 2013-2020 de la recherche à l'INERIS sur l'amélioration des méthodologies d'évaluation de la toxicité et de l'écotoxicité des substances chimiques reposent en partie sur le questionnement autour des méthodes alternatives dans le domaine de la toxicologie et de l'écotoxicologie prédictives. Aussi l'Institut poursuivra ses travaux sur les approches *in vitro* et *in silico*, principalement autour des mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens, mais aussi des passages transmembranaires et de la régulation hormonale. Déjà membre fondateur de FRANCOPA (Plateforme française dédiée au développement, à la validation et à la diffusion de méthodes alternatives en expérimentation animale), d'Antiopes (Infrastructure de recherche en toxicologie prédictive) et partenaire d'alliances pour la recherche, il renforcera ses réseaux et partenariats régionaux et nationaux autour d'équipements structurants.

Les attentes sociétales en matière de recours aux méthodes alternatives en expérimentation apparaissent en majorité raisonnées et cohérentes avec l'avancée de la recherche, l'analyse des enjeux et les évolutions réglementaires. Il ressort de l'enquête PICASO Alternatives qu'une majorité des répondants considère qu'il est encore trop tôt pour se passer totalement de l'expérimentation animale. Cependant, les préoccupations sur la souffrance animale et sur la sécurité d'utilisation des substances chimiques sont très présentes et partagées. Au-delà du sujet scientifique spécifiquement traité dans PICASO Alternatives, le retour d'expérience à en tirer pour l'INERIS concerne de façon plus globale sa capacité à renforcer la dimension sociétale dans son expertise scientifique et technique et sa recherche.

L'INERIS accompagne le développement des méthodes alternatives pour répondre aux préoccupations sociétales autour d'une démarche éthique en expérimentation animale.



LE DÉFI DES MÉTHODES ALTERNATIVES EN EXPÉRIMENTATION ANIMALE

Traditionnellement, les études toxicologiques sont conduites sur des animaux. Les évolutions réglementaires et les exigences éthiques ont été promotrices du développement de nouvelles approches en vue d'améliorer la prédiction des effets toxiques tout en réduisant les essais sur les animaux.

Les méthodes alternatives en expérimentation animale sont utilisées en recherche fondamentale, pour la réalisation d'études à visées réglementaire, de travaux cliniques, et aussi d'opérations de criblage en matière de développement de nouvelles molécules. Dans le domaine de la recherche, ces différentes méthodes sont des outils précieux qui permettent de mieux comprendre la physiologie des organismes et les mécanismes des effets des substances sur ces derniers. Ce développement repose sur des avancées intervenues dans le domaine des sciences du vivant, sans que l'objectif des développeurs n'ait été forcément d'améliorer les prédictions sur les dangers potentiels des substances réglementées ni même de développer des méthodes alternatives en expérimentation animale. En effet, les chercheurs considèrent avant tout l'intérêt de ces méthodes en tant qu'outils d'investigation et non en tant que méthodes alternatives. Il convient donc de noter la difficulté inhérente à l'identification tant des financements que des équipes de recherche sur les méthodes alternatives. Parmi les difficultés rencontrées, on trouve l'absence d'une nomenclature des méthodes permettant aux acteurs en amont de s'y sentir investis, et la difficulté du passage de la recherche amont vers des outils opérationnels.

Concernant la toxicologie et l'écotoxicologie, les fortes attentes sociétales en matière de santé environnement et les avancées scientifiques réalisées vis-à-vis de la compréhension des mécanismes d'effets obligent à repenser les approches traditionnelles de l'évaluation des effets des substances. À ces dispositions s'ajoute le besoin de disposer d'outils de criblage à fort débit pour être en mesure de tester rapidement des molécules dont le nombre ne cesse de croître. Ce constat pousse à une généralisation du recours à ces nouveaux outils mais aussi à l'adoption d'une nouvelle vision de l'approche prédictive qui

est privilégiée. Les acteurs engagés dans le développement ou l'utilisation des méthodes alternatives sont réunis au sein de plateformes. Il s'agit de créer les conditions d'une plus forte acceptabilité du recours aux méthodes alternatives dans les pratiques de la recherche et de l'enseignement, et de faire en sorte que ce mouvement se traduise au niveau réglementaire. Œuvrer à la reconnaissance par l'ensemble des parties prenantes de ces méthodes alternatives est le principal enjeu.

Le défi est d'obtenir de tous les acteurs et groupes concernés la reconnaissance de la pertinence des méthodes alternatives dans un certain nombre de domaines : leur validation dans un contexte réglementaire, leur utilisation en tant qu'outil de criblage industriel, ou qu'objet d'étude dans des publications scientifiques et, enfin, la reconnaissance de leur crédibilité par tous.

L'INERIS, acteur de la toxicologie prédictive, travaille depuis plusieurs années sur les méthodes alternatives. Le recours à ces méthodes, exigence éthique, est aussi une nécessité pratique dans un contexte réglementaire influant et, au-delà, dans un besoin de recherche socialement responsable y compris en accompagnement à l'innovation (développement de nouveaux produits, solutions de substitution). L'(éco-)toxicologie prédictive est une priorité pour l'Institut, qui dispose depuis 2006 d'un comité d'éthique sur la question de l'expérimentation animale. Enfin, déjà doté de capacités de modélisation, d'essais et de dispositifs expérimentaux d'envergure, à l'image de ses mésocosmes[1], l'INERIS entouré de ses partenaires académiques en Picardie a vu ses équipements structurants se renforcer. Ainsi, la plateforme expérimentale pour la validation et le développement des méthodes alternatives a été soutenue dans le cadre du Contrat de Projet État-Région 2007-2013. Les éléments scientifiques, réglementaires et sociétaux compilés dans ce dossier ne sont pas exhaustifs. Ils reposent sur un état des lieux constitué en interne à l'INERIS, sur la base de données collectées aux niveaux national et européen.

***note 1_** Dispositif expérimental clos qui permet d'étudier les effets des polluants en simulant à moyenne échelle les conditions d'un milieu aquatique.*

À l'image de ses mésocosmes, l'INERIS a vu ses équipements structurants se renforcer pour la validation et le développement des méthodes alternatives.

PICASO ALTERNATIVES : LA PRISE EN COMPTE DES ATTENTES SOCIÉTALES EN MATIÈRE DE MÉTHODES ALTERNATIVES EN EXPÉRIMENTATION ANIMALE

Mise en œuvre d'une méthode de criblage in vitro.

Dans le cadre de sa stratégie d'ouverture à la société, l'INERIS a engagé depuis plusieurs années des actions visant à renforcer son dialogue avec la société civile organisée sur des sujets qui représentent des enjeux sociétaux. INERIS Références fait partie des outils utilisés pour assurer ce dialogue. Ce second numéro, consacré aux méthodes alternatives en expérimentation animale à l'INERIS, consiste pour sa partie sociétale en une synthèse du projet de recherche PICASO Alternatives sur la « Place des méthodes alternatives en expérimentation animale dans le domaine santé-environnement : prise en compte des attentes sociétales » (2011-2013). Le Programme REPERE du ministère en charge de l'Écologie, qui finance le projet, explore les voies de la participation de la société civile organisée au pilotage de la recherche et de l'expertise. Coordonné par l'INERIS, PICASO Alternatives a été conduit en partenariat avec Écologie sans frontière (ESF), l'Association nationale de défense des consommateurs et usagers (CLCV) et la Coordination nationale médicale santé environnement (CNMSE), sous l'égide d'un tiers-veilleur.

La terminologie « méthodes alternatives » a été introduite en 1978 par David Smyth[2]. Elle regroupe les méthodes permettant de satisfaire un ou plusieurs principes des « 3R » (Remplacer - Réduire - Raffiner).

LES MÉTHODES ALTERNATIVES

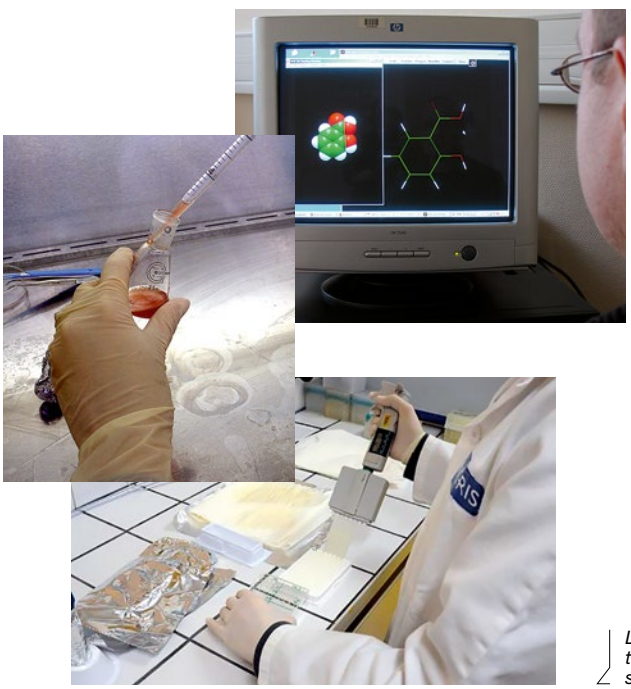
La prévention des éventuels effets néfastes liés à une exposition à un ou plusieurs agents chimiques, physiques ou biologiques présents dans notre environnement constitue un enjeu majeur de santé publique. Pour évaluer ces effets, l'expérimentation animale occupe encore aujourd'hui une place centrale. Ainsi, elle permet d'identifier :

- la nature des effets toxiques résultant de diverses conditions d'exposition rigoureusement contrôlées,
- les doses ayant induit ces effets toxiques,
- la pertinence pour l'homme de l'effet observé chez l'animal.

Depuis quelques années, sous l'impulsion de la réglementation européenne, les études toxicologiques ont néanmoins tendance à laisser une plus large place aux méthodes alternatives. Même si aujourd'hui l'expérimentation animale à des fins d'évaluation de la sécurité des produits chimiques est fortement remise en cause par les défenseurs des animaux, elle représente moins de 10% de l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales en Europe (figure 1). Les méthodes alternatives en expérimentation animale peuvent être regroupées de la façon suivante :

- **les méthodes de remplacement :** *in vitro* (modèles cellulaires) ; *in silico* (modèles biomathématiques utilisant des bases de données issues d'expérimentation *in vivo* ou *in vitro*) ; chimie analytique ; regroupement de substances et méthodes de références croisées…
- **les méthodes de réduction :** optimisation des protocoles *in vivo* ; *ex vivo* ; méthodes statistiques (par lesquelles on obtient plus d'informations à partir d'un seul protocole) ; contrôle de la variabilité de la réponse (par les paramètres environnementaux et le statut sanitaire et génétique des animaux) ; omics (techniques d'analyse explorant au niveau moléculaire la synthèse des protéines) ; modèles animaux transgéniques…
- **les méthodes de raffinement :** diminution de la douleur (examen clinique) ; imagerie du petit animal *in vivo* (IRM, ultrasons, bioluminescence, scintigraphie, tomographie) ; télémétrie (enregistrement de paramètres physiologiques en continu) ; utilisation d'espèces réputées moins sensibles, sachant que ces méthodes sont aussi des méthodes de réduction…

À ce jour, seule la réglementation sur les cosmétiques interdit le recours à l'expérimentation animale. Les méthodes alternatives sont le plus souvent recommandées dans des approches intégratives combinant l'ensemble des outils alternatifs disponibles afin de n'utiliser l'animal qu'en dernier recours, lorsque les autres méthodes n'ont pas permis d'apporter les informations suffisantes. On parle alors de stratégies de tests intégrés (ITS), qu'il est possible d'élaborer lorsque la connaissance sur les mécanismes d'action est suffisante. ■



Les méthodes alternatives en image : tests in vitro *et modélisation de la structure moléculaire.*

note 2_ *Alternatives to Animal Experiments, ISBN 0-85967-396-0.*

note 3_ *The Principles of Human Experimental Technique, ISBN-10 : 0900767782, ISBN-13 : 978-0900767784.*

LA RÈGLE DES «3R»

Élaborée en 1959 par Russell et Burch[3], la règle des «3R» constitue le fondement de la démarche éthique liée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord. Elle recommande de :

- **Remplacer les méthodes utilisant l'animal par des méthodes *in vitro* (étude sur cellules humaines ou animales) ou *in silico* (modélisation mathématique avec l'aide de l'informatique).**
- **Réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation.**
- **Raffiner les protocoles de façon à minimiser la douleur et la détresse imposées aux animaux, tout en préservant l'obtention d'un niveau élevé d'informations.**

+ D'INFO

http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc.

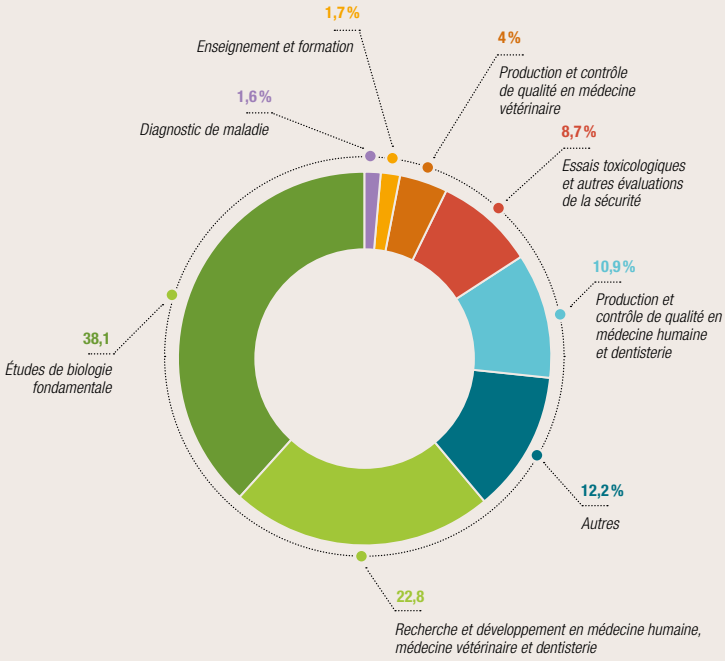
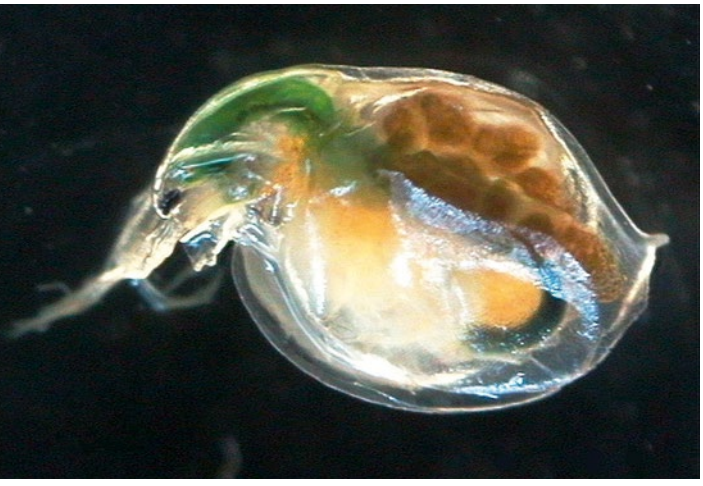


figure 1.
Les différents domaines d'application de l'expérimentation animale
source : 6ème rapport sur les statistiques concernant le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales et à d'autres fins scientifiques en Europe, CE 2010



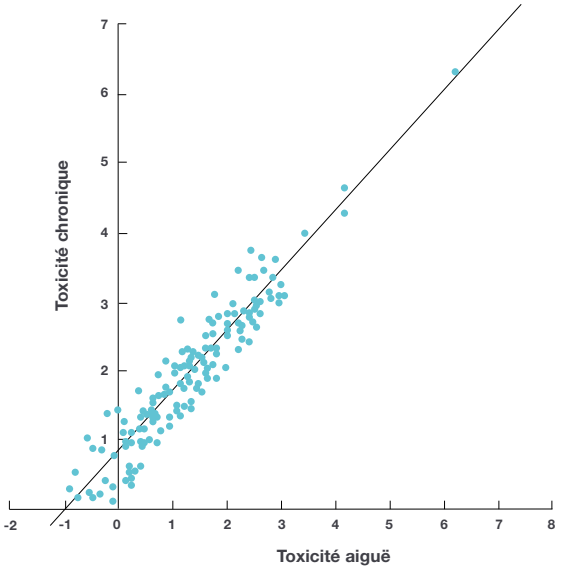


figure 2.
Un exemple de recours aux modèles mathématiques
Régression par la méthode des moindres carrés permettant de prédire la toxicité chronique des substances chimiques sur la daphnie en fonction de la toxicité aiguë. (Si l'information aiguë est disponible, elle peut permettre dans de nombreux cas de s'affranchir de la réalisation du test chronique).

REMPLACER, RÉDUIRE, RAFFINER L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE

UN CORPUS DE RÉGLEMENTATIONS EN FRANCE ET EN EUROPE

La réglementation sur le bien-être animal

En France, la loi du 10 juillet 1976 est la première législation traitant de la protection de l'animal, qui a inspiré les dispositions actuelles du Code Rural réglementant l'ensemble des pratiques vis-à-vis des animaux.

En Europe, les principes applicables à l'expérimentation animale sont d'abord définis par une directive de 1986 qui décline la règle des « 3R ». En 2009, l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (OPECST) rend un rapport sur « les principes applicables à l'expérimentation animale et les méthodes alternatives à celles-ci ». L'étude commanditée par le Bureau de l'Assemblée nationale est concomitante à la révision de la directive européenne de 1986. Il en ressort qu'afin de répondre aux préoccupations sociétales autour d'une démarche éthique en expérimentation animale, il est nécessaire de disposer de méthodes reconnues ou validées.

La nouvelle directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil, relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, se base elle aussi sur les principes éthiques structurés par la règle des « 3R ». Applicable depuis le 1er janvier 2013, elle demande, pour une procédure donnée quel que soit le domaine, que soient choisies en priorité les méthodes alternatives reconnues par l'Union Européenne, si elles existent.

La réglementation sur les substances chimiques

En ce début du XXIème siècle, les préoccupations des citoyens sont nombreuses autour de la santé ou de l'alimentation, et de nouvelles inquiétudes apparaissent en lien avec des filières ou des produits émergents. Le public réclame une utilisation sûre des bénéfices de la chimie. Plusieurs réglementations européennes appellent au développement de méthodes alternatives, de manière incitative ou contraignante, notamment celles relatives aux cosmétiques, aux produits pharmaceutiques et aux produits chimiques[4].

Avec REACH (Enregistrement, Évaluation, Autorisation et Restriction des Substances Chimiques fabriquées importées, distribuées et utilisées dans l'Union Européenne), on observe deux changements de mentalité majeurs :

- le renversement de la preuve : ce n'est plus aux autorités administratives de démontrer la toxicité d'une substance mais aux industriels d'en démontrer la maîtrise des risques,
- la nécessité de développer des méthodes alternatives en expérimentation animale, selon la règle des « 3R ».

Le recours aux méthodes alternatives pour les substances chimiques est aujourd'hui une nécessité, car les exigences de REACH, qui définit des critères de reconnaissance des méthodes alternatives, requièrent des résultats rapides et fiables.

« AFIN DE RÉPONDRE AUX PRÉOCCUPATIONS SOCIÉTALES AUTOUR D'UNE DÉMARCHE ÉTHIQUE EN EXPÉRIMENTATION ANIMALE, IL EST NÉCESSAIRE DE DISPOSER DE MÉTHODES RECONNUES OU VALIDÉES »

***note 4_** Cosmétiques : Règlement (CE) N° 1223/2009 ; Produits pharmaceutiques : Directive 2001/83/CE ; Produits chimiques : Règlement REACH (CE) N° 1907/2006 ; Classification, étiquetage et emballage des substances et mélanges : CLP - (UE) N° 2086/2011.*

100 000

SUBSTANCES CHIMIQUES INSCRITES À L'INVENTAIRE EUROPÉEN,
30 000 ***concernées par le volet enregistrement dans le REACH d'ici 2018,***
environ **9000** ***enregistrées en 2013***

Observation à la loupe binoculaire de daphnies.

LES INSTANCES ET LE PROCESSUS DE VALIDATION

Au niveau international, l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) joue un rôle essentiel dans la mise en place de lignes directrices sur les protocoles expérimentaux ainsi que sur les méthodes alternatives. Les lignes directrices de l'OCDE pour les tests sur les produits chimiques sont un ensemble de méthodes d'essais internationalement reconnues utilisées par les gouvernements, l'industrie et les laboratoires indépendants pour évaluer la sécurité des produits chimiques. Elles sont principalement utilisées pour les tests réglementaires de sécurité, la notification et l'enregistrement des »»

LA RÉGLEMENTATION REACH

REACH concerne les substances chimiques qui sont nombreuses et variées. Il ne concerne ni les médicaments ni les produits alimentaires. Les cosmétiques et les produits phytopharmaceutiques ou les biocides sont soumis à des réglementations spécifiques qui valent enregistrement dans REACH. L'ECHA, Agence européenne des produits chimiques, assure la mise en œuvre de REACH et assume la gestion et la coordination des aspects techniques, scientifiques et administratifs. En France, la Direction générale de la prévention des risques (DGPR) du ministère en charge de l'Écologie est l'autorité compétente désignée pour le règlement REACH.

Nota : les substances chimiques évoquées ci-dessus sont celles qui sont mises sur le marché. Les substances chimiques produites de façon non intentionnelle relèvent d'autres réglementations de maîtrise des pollutions (loi sur l'Air, directive cadre sur l'Eau…) qui abordent peu la question des méthodes alternatives.

+ D'INFO

The Use of Alternatives to Testing on Animals for the REACH Regulation (source : ECHA, 2011).

« UNE MÉTHODE RÉGLEMENTAIREMENT RECEVABLE DOIT APPORTER LES PREUVES QU'ELLE EST APPLICABLE DE FAÇON FIABLE ET RÉPÉTABLE EN DEHORS DES LABORATOIRES DE RECHERCHE. »

produits chimiques. D'autres organismes comme le CEN[5] en Europe et l'ISO[6] à l'international produisent des normes centrées sur la qualité des milieux. Mais ils ne disposent pas de programme de standardisation spécifique sur les méthodes alternatives.

En recherche fondamentale et appliquée, les méthodes alternatives sont utilisables librement, sans contrainte de standardisation. Ces méthodes sont scientifiquement reconnues par le processus classique de la validation par les pairs, i.e. la publication dans des revues scientifiques. Ces méthodes « reconnues » du point de vue scientifique peuvent être utilisées par les industriels en amont d'un processus de validation réglementaire pour du criblage, par exemple.

Lorsque les méthodes alternatives passent par un processus de validation réglementaire régi par des instances telles que l'ECVAM ou l'OCDE, on parle de méthodes « validées ». La validation réglementaire est plus contraignante et longue que la validation scientifique dans la mesure où une méthode recevable doit apporter, outre ce qui est demandé pour la reconnaître scientifiquement, les preuves qu'elle est applicable de façon fiable et répétable en dehors des laboratoires de recherche. Le règlement REACH permet de faire appel à des méthodes « reconnues » à côté des méthodes « validées », dans les dossiers réglementaires. Une étape intermédiaire de pré-validation pourrait augmenter la valorisation de la recherche et faciliter le passage à la normalisation ou à la validation réglementaire.

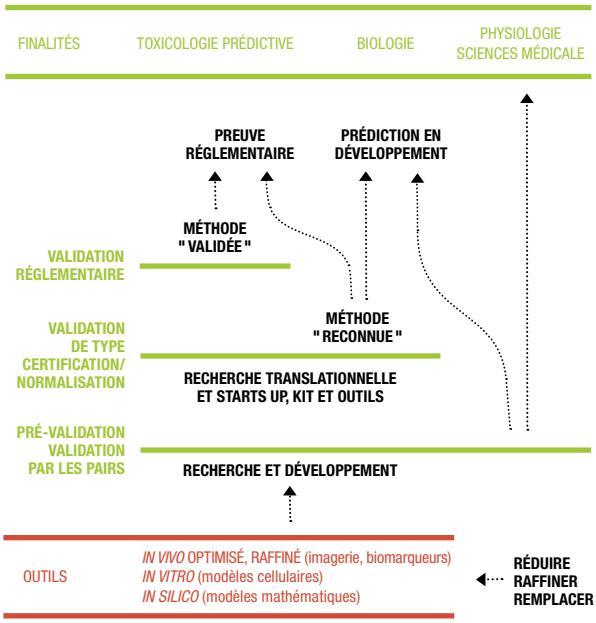


figure 3.
Le processus de validation
Si le développement de l'(éco-)toxicologie prédictive est une priorité de l'INERIS, l'Institut joue aussi un rôle dans la reconnaissance de ces méthodes, tout d'abord avec la validation du concept par les chercheurs. Mais, face au besoin croissant en méthodes alternatives, l'Institut va plus loin : compte tenu du temps nécessaire à la validation « réglementaire » et du besoin à utiliser en confiance ces méthodes dans d'autres contextes, l'INERIS réfléchit à la mise en place d'un processus de pré-validation.

note 5_ *Comité européen de normalisation.*
note 6_ *Comité international de normalisation.*

LE CENTRE EUROPÉEN POUR LA VALIDATION DES MÉTHODES ALTERNATIVES (ECVAM)

Le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM) a été créé par la Commission européenne en 1991 en vue de coordonner le développement et la validation de méthodes alternatives en expérimentation animale.

Cet organisme fait partie du Centre commun de recherche de l'Union Européenne (JRC), et dépend de l'Institut pour la santé et la protection du consommateur (IHCP). Face aux besoins croissants de développement et de validation de nouvelles méthodes, il est devenu le Laboratoire européen de référence pour les méthodes alternatives en expérimentation animale (EURL ECVAM) en 2011.

En 2013, EURL ECVAM met en place et coordonne le Réseau européen de laboratoires pour la validation des méthodes alternatives (EU-NETVAL). Le Réseau accompagne le Laboratoire de référence dans ses projets de validation, y compris sur les aspects formation, dissémination et identification des méthodes qui ont le potentiel de réduire, raffiner ou remplacer les animaux utilisés à des fins scientifiques. Il contribuera aussi au développement de documents guides, procédures, matériels de formation et outils de collaboration pour faciliter le développement, la validation et l'acceptation des méthodes alternatives. Le 3 juillet 2013, l'EURL ECVAM a annoncé les 14 premiers laboratoires (dont l'ECVAM) du réseau EU-NETVAL. Ces laboratoires disposent d'infrastructures de test *in vitro* respectant les "Bonnes pratiques de laboratoires" (BPL). À cette date, l'INERIS est le seul Institut français au sein de ce réseau. Enfin, l'ECVAM s'appuie sur le réseau PARERE pour l'évaluation préliminaire de la pertinence réglementaire d'une nouvelle méthode alternative. L'INERIS représente la France dans ce réseau.

+ D'INFO

http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam

tableau 1. ***Les 14 laboratoires du réseau EU-NETVAL.*** *3 juillet 2013.*

LABORATOIRES
1. **EUROPEAN COMMISSION** *(COORDINATOR)* The European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) GLP Test Facility. *Ispra, Italy*
2. **BELGIUM** Scientific Institute of Public Health (WIV-ISP) – Biological Standardisation Unit. *Brussels*
3. **CZECH REPUBLIC** National Reference Laboratory for Experimental Immunotoxicology. *Praha*
4. **FRANCE** INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques). *Verneuil en Halatte*
5. **FINLAND** FICAM (Finnish Centre for Alternative Methods), School of Medicine, University of Tampere. *Tampere*
6. **GERMANY** Celonic GmbH. *Jülich*
7. **GERMANY** Harlan Cytotest Cell Research GmbH. *Rossdorf*
8. **GERMANY** PRIMACYT - Cell Culture Technology GmbH. *Schwerin*
9. **ITALY** Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubehtini". *Brescia*
10. **NETHERLANDS** RIKILT-Institute of Food Safety. *Wageningen*
11. **NETHERLANDS** The Netherlands Organisation for Applied Scientific Research TNO. (Research Group Pharmacokinetics & Human Studies and TNO Triskelion BV). *Zeist*
12. **SPAIN** Eurofins Biolab S.L.U. *Barcelona*
13. **SPAIN** Spanish National Centre for Microbiology - Instituto de Salud Carlos III. *Madrid*
14. **SWEDEN** SP Sveriges Tekniska Forskningsinstitut, Medicinteknik (KMm). *Borås*

La question des méthodes alternatives en expérimentation animale n'est pas uniquement scientifique et technique. Elle ne peut se traiter sans réflexion préalable sur les approches philosophiques et sociologiques qui sous-tendent la thématique. C'est tout l'intérêt d'une collaboration sciences-société telle qu'elle a été définie dès l'origine et mise en œuvre dans le projet PICASO Alternatives (programme REPERE 2011-2013), duquel est tirée la synthèse qui suit. Source d'inquiétude collective et ancienne d'une part, d'inquiétudes individuelles liées « aux affaires » répétitives ces dernières années d'autre part, le développement et la sécurité des substances chimiques sont l'objet de nombreuses demandes.

UN PANORAMA QUI FAIT APPARAÎTRE 3 GROUPES DE POPULATIONS

Ce panorama est tiré de l'analyse du questionnaire grand public élaboré dans le cadre de PICASO Alternatives. L'échantillon est constitué de 2361 répondants.

LES SCIENTIFIQUES

Minoritaires dans l'échantillon PICASO Alternatives, ils constituent un groupe relativement peu homogène. Conscients des limites ou des besoins de validation des connaissances, les répondants appliquent le doute scientifique. Parfois confrontés à de violentes revendications, ils continuent à faire progresser leurs disciplines. Ils sont assez peu engagés dans le débat public et s'expriment majoritairement en utilisant un vocabulaire technique devant des auditoires spécialisés. En France, ils estiment être peu valorisés, et leurs recherches insuffisamment reconnues.

LES MILITANTS

Ils constituent un groupe très hétérogène dans l'échantillon :

◆ **les répondants des associations de consommateurs** se situent dans des attitudes rationnelles et bien informées. Ils sont plutôt favorables au développement des méthodes alternatives tout en émettant des réserves sur le *in silico*. Ils sont partagés sur l'effet prédictif pour l'homme des tests sur animaux ainsi que sur l'opposition « par principe » à toute expérimentation animale,

◆ **les répondants des associations « environnement et santé »** revendiquent leur rôle de précurseurs et de lanceurs d'alerte. Ils mènent des combats souvent personnalisés et se voient en levier de l'action publique. « Par principe », ils défendent la pertinence des méthodes alternatives, suivent et appuient le développement des législations européennes tout comme ils se positionnent plutôt contre l'expérimentation animale,

Le dialogue permet d'établir les bases de la confiance entre les groupes de populations.

Cette synthèse a été élaborée sur la base de :
2 361 répondants au questionnaire grand public,
285 membres du groupe Facebook,
10 lanceurs d'alerte et 3 groupes de discussion.

4 OUTILS POUR IDENTIFIER LES ATTENTES SOCIÉTALES DANS PICASO ALTERNATIVES.

- **Des groupes de discussion animés par la CLCV.**
- **Un groupe Facebook animé par ESF.**
- **Un questionnaire aux lanceurs d'alerte coordonné par la CNMSE.**
- **Un questionnaire grand public diffusé par l'INERIS et relayé par ses partenaires.**

Nota : L'élaboration du questionnaire a donné lieu à de nombreuses discussions au sein du comité de pilotage du projet PICASO Alternatives. Suite au constat d'un nombre trop important de questions et aux difficultés de terminologie ou de compréhension de certaines formulations, une nouvelle version a été élaborée après une pré-enquête. Cela est considéré comme une première étape de la rencontre souhaitée entre société civile et spécialistes dans le projet.

◆ **les répondants des associations de défense de l'environnement** ont des positions moins systématiques que les suivants vis-à-vis des organismes auxquels ils font confiance pour s'informer. Ils croient à l'indépendance de la recherche mais considèrent eux aussi que les questions de sécurité des substances chimiques ne sont pas du seul ressort des experts,

◆ **les répondants des associations de défense des animaux** sont majoritaires dans l'échantillon associatif et engagés depuis 1976 dans la défense de la cause animale. Ils militent pour l'interdiction totale du recours à l'expérimentation animale. L'homogénéité des réponses de ce groupe qui était le plus motivé dans cette enquête montre un certain dogmatisme basé sur une question de principe peu susceptible d'évoluer, leurs informations ne provenant que de leurs propres sources. Ces répondants ne croient pas en une recherche indépendante sur les effets des substances chimiques et estiment que les questions de sécurité ne peuvent pas être du seul ressort des experts.

LES PERSONNES N'APPARTENANT À AUCUNE ASSOCIATION

Elles représentent deux tiers de l'échantillon. Ces répondants manifestent une véritable inquiétude sur la sécurité des substances chimiques : ils se sentent exposés au quotidien, sont partagés sur l'indépendance de la recherche et sur la confiance à accorder aux résultats des tests sur animaux. Ils sont dans une demande de sécurité raisonnée et contrôlable et sont partisans de commissions plurielles et ouvertes à la société pour évaluer la sécurité des substances. Ils s'opposent « par principe » à l'expérimentation animale et considèrent en majorité que certaines méthodes alternatives sont au moins aussi pertinentes, en particulier pour tester les mélanges, tout en étant conscients des limites. Ils sont demandeurs d'une biodégradabilité totale des produits mis sur le marché.

On peut ainsi voir se dessiner les populations entre lesquelles il est possible d'établir dès maintenant le dialogue ; certaines associations sont très sensibles à la fois au bien-être animal et au besoin de confiance dans l'évaluation des produits chimiques. Pour ces associations, l'enjeu du dialogue est la prise en compte de leurs attentes et l'ancrage scientifique de leurs connaissances. Pour les scientifiques, établir un rapport de confiance avec ces populations permet d'asseoir l'insertion sociétale de leurs travaux et d'en améliorer la valorisation.
Il est par ailleurs important de souligner que le rejet « par principe » (en référence à la question posée) de l'expérimentation animale des associations se situe dans le champ de l'émotionnel, en réaction au long déni de la souffrance animale. Mais pour argumenter leur discours et asseoir leur crédibilité, les associations se réfèrent et utilisent les données scientifiques, voire commanditent elles-mêmes des études.

+ D'INFO

www.programme-repere.fr

***L'Institut travaille au développement de méthodes alternatives en expérimentation animale depuis une vingtaine d'années avec deux axes de recherche : les approches* in vitro *et* in silico.**

LES AXES DE RECHERCHE

Les activités de recherche menées, au sein du pôle « Dangers et impact sur le vivant » de la Direction des risques chroniques de l'INERIS, alimentent les connaissances sur les substances chimiques. La participation aux réseaux d'experts tels ceux de l'OCDE et de l'ECVAM permet d'échanger sur les stratégies méthodologiques et expérimentales développées et contribue à leur conférer une validation internationale. Toutes ces activités de recherche sur les substances chimiques et la qualité des milieux sont largement valorisées et représentent plus du tiers des publications scientifiques de l'INERIS. Les travaux s'appuient sur des installations d'essais en toxicologie et écotoxicologie (animalerie poisson, mammifère, plateforme de modélisation, bioessais), et sur des campagnes de terrain (faune aquatique). Enfin, le pôle est impliqué dans de nombreuses structures mixtes.

S'agissant plus spécifiquement des méthodes alternatives, l'Institut travaille à leur développement depuis une vingtaine d'années, avec deux axes de recherche en (éco-) toxicologie. Il contribue également au processus de (pré-) validation récemment renforcé en Europe avec la création du Réseau européen de laboratoires pour la validation des méthodes alternatives. Enfin, l'Institut est membre fondateur de la plateforme nationale pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale FRANCOPA et assure le secrétariat général de l'infrastructure de recherche en toxicologie prédictive Antiopes.

La compréhension des mécanismes d'action, en particulier le potentiel perturbateur endocrinien (PE) d'une substance, est un préalable au développement des axes de recherche et de validation des méthodes alternatives à l'INERIS. Ces axes de recherche concernent :

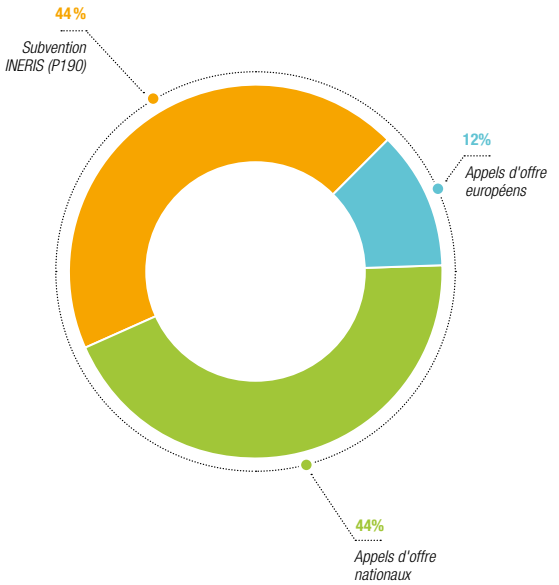


figure 4.
Répartition des travaux de recherche INERIS en lien avec les méthodes alternatives selon la source de financement
L'ensemble de ces activités de recherche mobilise environ 15 équivalents temps plein (ETP) à la Direction des risques chroniques de l'INERIS pour un budget annuel de l'ordre de 1,5 M€.
source : PICASO Alternatives / REPERE, 2013

LE DÉVELOPPEMENT ET LA PRÉ-VALIDATION DE TESTS *IN VITRO* (AXE 1)

◆ **pour l'évaluation du potentiel perturbateur endocrinien (PE) des substances chimiques** : élaboration de tests rapides et sensibles sur embryon et larve de poisson pour l'évaluation du potentiel PE de polluants organiques environnementaux (approche de criblage) ; évaluation des effets sur la reproduction chez le poisson (approche intégrée *in vitro* / *in vivo*) ; identification de substances toxiques dans l'environnement (couplage *in vitro* / frac- »»

UNE MÉTHODE DE RÉDUCTION / RAFFINEMENT : **LE PROJET NEMO**

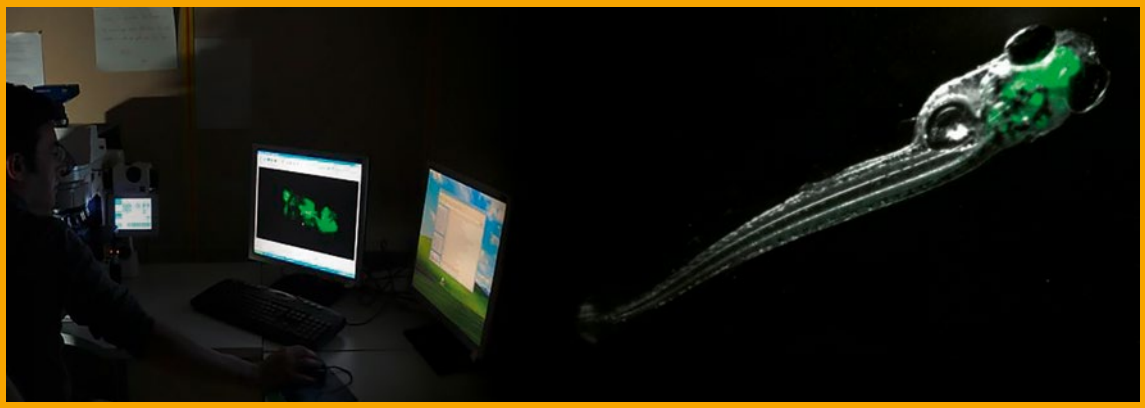
Développement et soumission d'une méthode alternative à l'OCDE : le test EAZSY. Démonstration du passage R&D à un outil opérationel en vue de sa validation réglementaire.

L'évaluation du potentiel perturbateur endocrinien (PE) des substances chimiques, leurs détections et leurs identifications dans les milieux aquatiques constituent des enjeux majeurs en raison des risques posés par ces substances sur les populations et les écosystèmes. Dans ce contexte, l'INERIS et l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) ont récemment développé un bioessai *in vivo* chez l'embryon de poisson zèbre transgénique exprimant une protéine fluorescente verte (GFP) sous le contrôle du promoteur du gène cyp 19a1b de poisson zèbre. Le gène cyp 19a1b code l'aromatase cérébrale qui s'exprime dans le cerveau et est exclusivement régulée par les œstrogènes. L'embryon de poisson étant translucide, la fluorescence de la GFP peut être facilement mesurée. Une originalité du test réside dans sa dernière étape, qui consiste à quantifier la GFP par des techniques d'imagerie du petit animal vivant. Compte tenu de ses caractéristiques, le bioessai est utilisable pour tester les effets des substances seules mais aussi pour les mélanges. 21 composés sur 45 testés ont induit l'expression de la GFP, à des degrés variables. Le développement de ce test a en particulier mis en relief la capacité de biotransformation des substances PE. En effet, une fois dégradées par l'organisme, certaines substances n'induisant pas elle-même d'effet œstrogénique produisent des métabolites qui eux, en provoquent. Cet outil vient compléter les dispositifs *in vitro* existants : il a l'avantage d'intégrer le devenir des polluants dans l'organisme, ce que les tests cellulaires ne permettent pas. Il présente donc un réel intérêt pour l'évaluation de substances chimiques avant leur mise sur le marché comme le requiert REACH mais aussi pour la surveillance des milieux aquatiques mise en place par la directive cadre sur l'eau. Ce bio-essai fait l'objet d'un projet de ligne directrice qui a été déposé à l'OCDE en novembre 2012.

+ D'INFO

Brion et al. Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures *In Vivo* Using Transgenic (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos. PLoS ONE, 2012, 7 (5) : p. e36069. www.plosone.org.

Analyse in vivo *de la fluorescence chez des poissons zèbres transgéniques exposés à une substance.*



« LES DEUX AXES DE RECHERCHE PEUVENT DONNER LIEU À TERME À DES LOGIQUES "SUBSTITUTIVES" PURES, MAIS ELLES S'INSCRIVENT ÉGALEMENT DANS LES STRATÉGIES DE TESTS INTÉGRÉS (ITS), PERMETTANT DE RÉDUIRE LE NOMBRE D'ESSAIS SUR ANIMAUX »

tionnement physico-chimique / analyse chimique). Les recherches sont financées par le Plan National de recherche sur les perturbateurs endocriniens, l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et le post-Grenelle[7] et réalisées dans le cadre de collaborations,

◆ **pour l'évaluation de la toxicité générale et du passage transmembranaire des substances chimiques** : barrières alvéolo-capillaire au niveau du poumon, hémato-encéphalique au niveau du cerveau, hémato-testiculaire au niveau des gonades et hémato-placentaire entre la mère et l'embryon ou le fœtus. Les projets afférents à ces objectifs sont effectués dans le cadre des programmes de l'ANR avec des collaborations nationales et régionales.

Élevage et reproduction de poissons zèbres.

LE DÉVELOPPEMENT ET LA PRÉ-VALIDATION DE MODÈLES MATHÉMATIQUES (AXE 2)

◆ **pour l'évaluation de la dangerosité des substances grâce à des méthodes informatiques** : modèles QSARs (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) et PBPK (*Physiologically Based PharmacoKinetic*). Ces modèles sont capables d'exploiter des informations physico-chimiques et les résultats des tests *in vitro* pour proposer une évaluation du risque sur le vivant. Cette activité est soutenue par des programmes européens (6ème et 7ème programmes cadres), nationaux (ANR, post-Grenelle), avec des collaborations internationales et nationales.

Cette capacité a permis de contribuer à la mise en place de la première chaire de modélisation mathématique pour la toxicologie systémique à l'Université Technologique de Compiègne (UTC).

LES STRATÉGIES DE TESTS INTÉGRÉS (ITS)

Les deux axes de recherche précédents peuvent donner lieu à terme à des logiques « substitutives » pures, mais elles s'inscrivent également dans les stratégies de tests intégrés (ITS), permettant de réduire le nombre d'essais sur animaux en sélectionnant les séries de tests qui optimisent le gain d'information toxicologique au moindre coût expérimental. Dans le domaine des ITS, le projet CANTO[8] a permis de répondre à deux des besoins récurrents dans le domaine de la toxicologie prédictive : l'évaluation de l'incertitude liée aux prédictions QSAR et la prédiction de la performance d'une batterie de tests en fonction de la seule structure moléculaire de la substance à toxicité inconnue. Pour ces deux besoins, il propose des solutions innovantes qui permettent de prédire la performance de plusieurs stratégies de test et les coûts monétaire et éthique (nombre d'animaux à sacrifier) associés à chacune d'entre elles. Son périmètre d'application n'est pas limité à la toxicologie réglementaire pour les substances existantes mais il peut être étendu à des substances en cours de développement. Ce projet a en outre permis d'intégrer des avancées méthodologiques dans le domaine de la toxicologie prédictive *in silico* avec des outils informatiques d'avant-garde au sein de la plateforme informatisée MAPS (*Materials Processes and Simulations*). ■

note 7_ Avenant Grenelle au contrat d'objectifs État-INERIS (2009).

note 8_ Projet ANR 2007 conduit par l'INERIS et Scienomics.
Plus d'info : Pery A.R, Desmots S., Mombelli E. Substance-tailored Testing Strategies in Toxicology : an in Silico Methodology Based on QSAR Modeling of Toxicological Thresholds and Monte Carlo Simulations of Toxicological Testing. Regul. Toxicol. Pharmacol. 56 (2010), p. 82-92.

+ D'INFO

http://scienomics.com/

UNE MÉTHODE DE PRÉDICTION *IN SILICO* : **LE SYSTÈME BENIGNI-BOSSA**

Les outils QSAR dans un contexte réglementaire : validation du système Benigni-Bossa, pour l'analyse du potentiel mutagène et carcinogène d'une substance chimique, par l'INERIS.

En 2010, l'INERIS s'est associé au Centre de traitement de l'information scientifique (CTIS) pour évaluer une partie des modèles QSAR de la boîte à outil de l'OCDE (QSAR *Toolbox*). Cette boîte à outils et « Toxtree » sont incontournables dans un contexte réglementaire. Ils permettent à l'utilisateur de recourir à plusieurs modèles et, notamment, au système « Benigni - Bossa » constitué de 3 modèles QSAR intégrés à Toxtree qui servent à prédire le potentiel mutagène et carcinogène des substances chimiques, sur la seule base de leur structure chimique. L'objectif de l'étude était double : fournir une validation scientifique des trois modèles QSAR qui forment le système « Benigni-Bossa » et mettre en évidence les problèmes relatifs à l'utilisation pratique des deux outils lors de l'application du même système. Les résultats principaux de cette double étude montrent que les principes de validation de l'OCDE pour les modèles QSARs ne sont pas rigoureusement respectés et que les performances des outils sont inférieures à celles déclarées par le mode d'emploi du système « Benigni-Bossa ». De plus, plusieurs problèmes strictement liés à des détails d'implémentation informatique du système « Benigni-Bossa » à l'intérieur des deux outils peuvent donner lieu à des résultats prédictifs erronés, indépendamment de la validité scientifique du système. L'outil Toxtree présente une transparence supérieure à la boîte à outils QSAR.

+ D'INFO

Mombelli et al. Evaluation of the OECD QSAR application Toolbox and Toxtree for Predicting and Profiling the Carcinogenic Potential of Chemicals. SAR and QSAR in Environmental Research, 2010 (21), n°7-8 : p. 731-752. Benigni R. et al. The Benigni - Bossa Rulebase for Mutagenicity and Carcinogenicity. A module of Toxtree (EUR 23241 EN 2008 - ISSN 1018-5593). http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm.

Interface graphique de Toxtree (2.6.0).

Interface graphique de la boîte à outils QSAR de l'OCDE (3.1.0.21).

L'amélioration des méthodologies d'évaluation de la toxicité et de l'écotoxicité de substances chimiques repose en partie sur le questionnement autour des méthodes alternatives dans le domaine de la toxicologie et de l'écotoxicologie prédictives. Le travail s'intègre dans celui plus large de l'équipe qui cherche à développer des outils de caractérisation de la toxicité et de l'écotoxicité des substances chimiques. L'Institut ne travaille cependant pas sur tous les types d'effets, est en particulier exclue la cancérogénicité.

FEUILLE DE ROUTE 2013-2020 DE LA RECHERCHE À L'INERIS

Le défi est scientifique et applicatif. Il faut en effet disposer de méthodes pertinentes et prédictives d'effets biologiques non totalement caractérisés et, d'autre part, reconnues par les utilisateurs, gestionnaires et industriels. Les travaux de l'INERIS porteront donc sur ces 2 aspects.

3 AXES DE TRAVAIL INTERDÉPENDANTS

Axe 1 : les approches *in vitro*

Les travaux de développement et de validation s'orienteront vers une prise en compte plus exhaustive des mécanismes d'actions des perturbateurs endocriniens (PE) dans le but de valider des tests *in vitro* et *in vivo* aptes à fonder un diagnostic sur le potentiel PE des substances chimiques, et de les intégrer dans une stratégie de tests raisonnée et pertinente chez le poisson. Concernant le développement de tests sur embryon et larve de poisson, l'INERIS continuera également à participer au raffinement des méthodes *in vivo*, avec la recherche des biomarqueurs qui permettent des expérimentations dont le contenu scientifique est largement amélioré. Les travaux sur l'évaluation de la toxicité générale et du passage transmembranaire des substances chimiques se poursuivront.

Axe 2 : les approches *in silico*

Les travaux porteront sur l'optimisation et la validation de méthodes mathématiques qui soutiennent la toxicologie et l'écotoxicologie prédictive (modèles QSAR pour prédire les résultats des tests, modèles PBPK pour intégrer les résultats de modèles QSAR et de tests *in vitro*, modèles de régulation hormonale en appui à l'évaluation des effets des perturbateurs endocriniens). Pour cela, des projets de recherche seront développés pour améliorer l'applicabilité des outils existants et la qualité des prédictions issues de méthodes alternatives sera évaluée. L'incertitude associée aux paradoxes de similarité dans les QSAR sera davantage caractérisée. L'Institut participera également à des groupes européens de réflexion autour d'une meilleure reconnaissance et d'une validation des méthodes alternatives *in silico*.

LES OBJECTIFS DE RECHERCHE

- Faire la preuve du concept: développer et valoriser scientifiquement les méthodes alternatives
- Contribuer à leur pré-validation: construire le lien entre R&D et outils opérationnels
- Optimiser et contribuer à la validation des approches prédictives

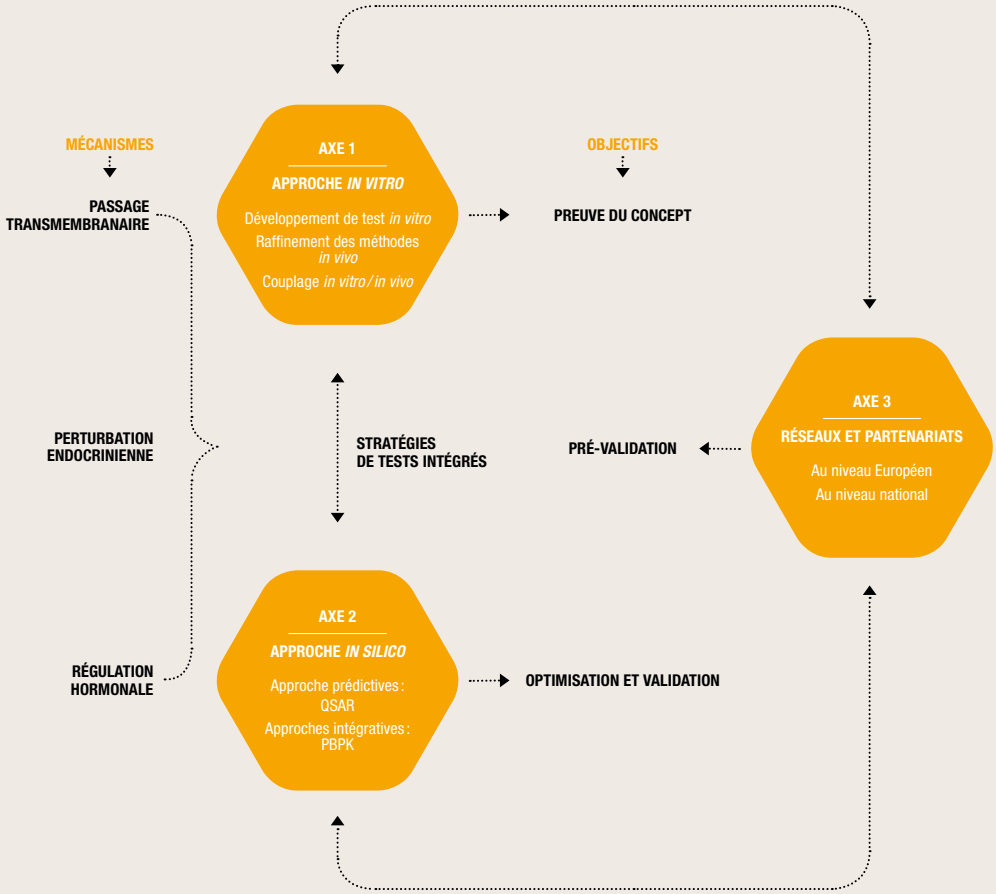


figure 5.
Les 3 axes de recherche sur les méthodes alternatives
Méthodes, mécanismes et objectifs prioritaires.

Axe 3 : les réseaux et partenariats

Dans les années à venir, l'INERIS, en association étroite avec ses partenaires du pôle applicatif en toxicologie - écotoxicologie, s'engagera dans la démarche de reconnaissance de ces méthodes à différents niveaux : la validation du concept par les chercheurs et la (pré-) validation. Cette action transversale concernera dans une large mesure des méthodologies développées par d'autres. Par ailleurs, les liens avec l'UTC et l'Université de Picardie Jules Verne (UPJV) seront renforcés au niveau régional, autour du couplage d'outils *in vitro* et *in silico* en toxicologie prédictive et des analyses mathématiques.

Dans cet esprit, l'INERIS a proposé la mise en place, dans le cadre de la Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens (SNPE), d'un partenariat public-privé autour d'une plateforme permettant la pré-validation de méthodes d'essai et d'évaluation du caractère perturbateur endocrinien de substances et de mélanges. Celle-ci doit porter des méthodes non encore validées à un bon niveau de qualification et garantir une bonne crédibilité dans le dialogue entre parties prenantes et pour les groupes d'experts les utilisant ; offrir une sécurité juridique raisonnable dans le développement de substances, notamment dans un contexte de substitution ; permettre une bonne reconnaissance européenne et accélérer le passage à une reconnaissance multilatérale entre états.

QUELQUES PUBLICATIONS RÉCENTES

Beaudouin R., Pery A.
Comparison of Species Sensitivity Distributions based on Population or Individual Endpoints
Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, 32 (5) : p. 1173-1177

Bois F.-Y.
Computational Pharmacokinetics at a Crossroads (Editorial)
In Silico Pharmacology, 2013, 1 (1) : part 5

Brion et al.
Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures *In Vivo* Using Transgenic (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos
PLoS ONE, 2012, 7 (5) : p. e36069

Garric J., Thybaud E.
Modèles de toxicologie environnementale
Lahmani M., Marano F., Houdy P. (Dir.), Les Nanosciences, Tome 4 : Nanotoxicologie et nanoéthique, Paris : Belin, 2010, p. 401-417

Hubert Ph., Toulhoat P.
Les méthodes alternatives en matière d'expérimentation animale
Annales des Mines, Responsabilité et Environnement, 2013 (71) : p. 19-23

Mombelli E., Pery A.
A Linear Model to Predict Chronic Effects of Chemicals on Daphnia Magna
Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2011, 87 (5) : p. 494-498

Mombelli et al.
Evaluation of the OECD QSAR Application Toolbox and Toxtree for Predicting and Profiling the Carcinogenic Potential of Chemicals
SAR and QSAR in Environmental Research, 2010 (21), n°7-8 : p. 731-752

Pery A. et al.
Predicting *In Vivo* Gene Expression in Macrophages after Exposure to Benzo(a) pyrene based on *In Vitro* Essays and Toxicokinetic/Toxicodynamic Models
Toxicology Letters, 2011, vol. 201 (1), p. 8-14

Pery et al.
Prediction of Dose-Hepatotoxic Response in Humans based on Toxicokinetic/Toxicodynamic Modeling with or without *In Vivo* Data : a Case Study with Acetaminophen
Toxicology Letters, 2013, 220 (1) : p. 26-34

Pery et al.
Substance-Tailored Testing Strategies in Toxicology : an *In Silico* Methodology based on QSAR Modeling of Toxicological Thresholds and Monte Carlo Simulations of Toxicological Testing
Regul. Toxicol. Pharmacol. 2010 (56) : p. 82-92

Quignot N., Bois F.-Y.
A Computational Model to Predict Rat Ovarian Steroid Secretion from *In Vitro* Experiments with Endocrine Disruptors
PLos ONE, 2013, 8 (1) : p. e53891

Santos R. et al.
Relationship between DNA Damage in Sperm after Ex Vivo Exposure and Abnormal Embryo Development in the Progeny of the Three-Spined Stickleback
Reproductive Toxicology, 2013 (36) : p. 6-11

Tebby C., Mombelli E.
A Kernel-based Method for Assessing Uncertainty on Individual QSAR Predictions
Molecular Informatics, 2012, 31 (10) : p. 741-751

LA RECHERCHE EUROPÉENNE À L'HORIZON 2020

150 M€

CONSACRÉS À LA RECHERCHE SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES À VISÉE RÉGLEMENTAIRE PAR L'EUROPE DANS SES 6ÈME ET 7ÈME PCRD

325 M€ *de besoins exprimés à l'horizon 2020*

AXLR8, action de coordination financée par le 7ème programme cadre de recherche et développement (PCRD) de la Commission Européenne, est le point focal de la coordination des programmes de recherche fondés sur les «3R» conduits en Europe et à l'international. Dans son 5ème rapport d'étape publié en 2012 sur les avancées de la recherche en matière de stratégies de tests alternatifs[9], AXLR8 esquisse une première feuille de route d'une recherche collaborative et innovante en matière de méthodes alternatives à l'horizon 2020 :

Les effets prioritaires : cancer, reproduction, développement, système immunitaire et allergies et toxicité chronique à doses répétées.

Les moyens privilégiés : le développement, la qualification et l'intégration d'outils *in vitro* basés sur la biologie humaine en lien avec les outils *in silico*, en particulier pour relier les résultats *in vitro* au «monde réel».

Les leviers : les partenariats public-privé, une stratégie «top-down» centrée sur l'identification et la compréhension des mécanismes d'action toxique et des déterminants de santé au niveau individuel (homme) et populationnel (écosystème).

note 9_ Alternative Testing Strategies Progress Report 2012. ISBN 978-3-9814126-5-9

+ D'INFO

http://axlr8.eu/

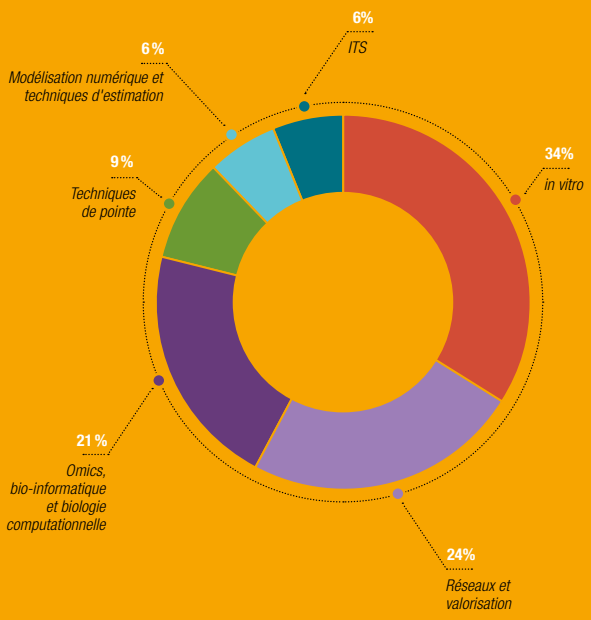


figure 6.
Répartition du financement des projets sur les méthodes alternatives
source : PICASO Alternatives / REPERE

NB : ces projets représentent 1,5 % du budget total alloué aux «Sciences du vivant, génomique et biotechnologie de la santé», dans les 6ème et 7ème programmes-cadre. La participation des laboratoires français de recherche publique et privée représente 8 % au total.

PRÉCONISATIONS DE LA CORE
SUR LES TRAVAUX DE L'INERIS

Ce dossier a été examiné par les membres de la Commission d'Orientation de la recherche et de l'expertise (CORE) qui s'est réunie le 13 novembre 2013. Elle recommande :

◆ de poursuivre la montée en puissance sur la toxicologie et l'écotoxicologie, en clarifiant les domaines exclus du champ d'expertise de l'Institut,

◆ de se pencher sur la validité du modèle animal en analysant les cas où il s'est révélé défaillant,

◆ d'accompagner la valorisation de cette recherche par une double approche : un expert adaptant ses propos pour les partager avec les représentants de la société civile organisée ; un relais d'opinion qui, s'étant approprié scientifiquement le sujet, l'explique au plus grand nombre.

LA CORE EN QUELQUES MOTS

La Commission d'Orientation de la Recherche et de l'Expertise (CORE) est l'une des instances de gouvernance de l'INERIS. Officialisée par l'arrêté ministériel du 26 avril 2011 relatif aux comités d'orientation scientifique et technique de l'INERIS, elle marque le passage d'une gouvernance uniquement scientifique à une gouvernance scientifique et sociétale, portant également sur les activités d'expertise et d'appui aux pouvoirs publics. Fort de quinze membres, elle réunit en six collèges des représentants de différents secteurs de la société : monde académique, industriels, Organisations Non Gouvernementales (ONG), syndicats, élus et Etat. Elle concrétise la démarche d'ouverture à la société de l'INERIS.

La CORE a trois grandes missions : partager les enjeux et les questionnements sociétaux ; appuyer la diffusion des résultats des recherches et expertises de l'INERIS ; contribuer à la programmation de ses travaux scientifiques et techniques.

CHRONOLOGIE DE LA DÉMARCHE D'OUVERTURE À LA SOCIÉTÉ DE L'INERIS

AVRIL 2005
Visite de la délégation de parlementaires de la commission « Développement durable et aménagement du territoire ». Au cours de sa visite, la commission a encouragé l'Institut à développer la capacité de ses experts et chercheurs à participer au débat public.

SEPTEMBRE 2006
Le renforcement de la capacité des experts à participer au débat public est inscrit dans le contrat d'objectifs 2006-2010 signé entre l'État et l'INERIS.

2007 - 2008
Renforcement de l'ouverture à la société de l'Institut en parallèle du Grenelle de l'Environnement. Démarrage des réunions ONG.

AVRIL 2008
Organisation de la première rencontre-débat avec des représentants d'ONG et d'associations en vue d'échanger sur les résultats de travaux de recherche ou d'expertise de l'Institut. 24 autres débats ont été organisés depuis lors.

MAI 2008
Le conseil d'administration donne un avis favorable à l'évolution envisagée par l'INERIS de ses instances d'évaluation scientifique et technique. Il engage l'Institut à effectuer les démarches nécessaires pour préciser ses propositions.

OCTOBRE 2008
Signature d'une charte d'ouverture à la société avec l'IRSN et l'AFSSET.

JUIN 2009
◆ Ouverture du séminaire scientifique annuel de l'Institut à la société civile. La création d'une Commission d'orientation de la recherche et de l'expertise (CORE), composée de représentants des différentes composantes de la société, y est décidée.
◆ Signature de l'avenant Grenelle au contrat d'objectifs État-INERIS qui fixe notamment pour objectif l'élargissement de la gouvernance scientifique à de nouveaux acteurs.

SEPTEMBRE 2009
Le conseil d'administration est informé des modalités d'évolution de la gouvernance scientifique de l'Institut discutées lors du séminaire de juin.

MARS 2010
Réunion de pré-figuration de la CORE à l'INERIS.

JUIN 2010
1ère participation de la CORE au séminaire des orientations scientifiques et techniques de l'INERIS portant sur la préparation du contrat d'objectifs 2011-2015 de l'Institut.

SEPT. PUIS DÉC. 2010
L'INERIS adopte, par délibération du conseil d'administration, la charte nationale de l'expertise qui prévoit dans son article 9 des dispositions particulières relatives au devoir d'alerte. Le protocole de gestion des ressources publiques signé avec l'État en décembre prévoit donc pour l'INERIS d'entreprendre l'investigation « en amont » des suites à donner « en cas d'expression en son sein d'un risque, notamment à caractère environnemental ou sanitaire » et précise que les rapports qui en seront issus ont vocation à être présentés à la CORE pour avis.

OCT. ET NOV. 2010
1ères réunions de travail de la CORE qui s'implique notamment sur les travaux de hiérarchisation des substances chimiques conduits par l'Institut.

AVRIL 2011
Parution au Journal Officiel de l'arrêté ministériel relatif aux comités d'orientation scientifique et technique de l'Institut national de l'environnement industriel et des risques. La CORE est officiellement créée.

SEPTEMBRE 2011
Le conseil d'administration est informé de l'élargissement du comité de suivi de la charte de déontologie à un membre de la CORE issu du collège associations.

SEPT. - OCT. 2011
Les membres de la CORE sont nommés par le Directeur général de l'INERIS après consultation du conseil scientifique pour une durée de trois ans renouvelable.

AVRIL 2012
Le conseil d'administration de l'INERIS approuve la proposition de nomination du président et vice-président de la CORE.

2013
Poursuite des activités de la CORE et organisation de 5 réunions ONG.

LES MÉTHODES ALTERNATIVES REÇOIVENT UN ACCUEIL POSITIF MAIS LUCIDE

Les attentes sociétales en matière de recours aux méthodes alternatives en expérimentation animale apparaissent en majorité raisonnées et cohérentes avec l'avancée de la recherche et les évolutions réglementaires, malgré certains comportements stéréotypés. Il ressort de l'enquête PICASO Alternatives qu'une majorité des répondants considère qu'il est encore trop tôt pour se passer totalement de l'expérimentation animale. Cependant, les préoccupations sur la souffrance animale et sur la sécurité d'utilisation des substances chimiques sont très présentes et partagées. Les méthodes alternatives reçoivent un accueil positif mais lucide, mettant l'accent sur le besoin d'un recul et d'une fiabilité jugés encore insuffisants. Ainsi, de nombreuses pistes destinées à instaurer la confiance sont proposées par les répondants du projet REPERE PICASO Alternatives. L'enjeu actuel de l'ouverture des sciences vers la société civile consiste à faire connaître les limites des connaissances et les progrès réalisés. Il remet aussi la responsabilité de l'expérimentateur, considérée par certains comme le « 4ème R », au cœur de la question du raffinement de l'expérimentation animale[10]. Enfin, les enjeux géopolitiques de l'éthique de l'expérimentation animale ne doivent pas être sous-estimés, ce qui doit conduire à proposer des démarches rationnelles basées sur des fondements acceptés par tous.

Les évolutions réglementaires, structurelles et organisationnelles récentes, en Europe comme en France, vont dans le sens de renforcer le développement, la validation, l'utilisation, la valorisation et la reconnaissance des méthodes alternatives dans une logique de stratégies de tests intégrés, à des fins réglementaire »»

EXEMPLE DE LA DÉMARCHE DE L'ACADÉMIE VÉTÉRINAIRE DE FRANCE

À titre d'exemple, les fondements de la pratique de l'expérimentation animale énoncés en 2012 par l'Académie Vétérinaire de France[11] sont les suivants :

- **Le recours à l'expérimentation animale est indispensable aux progrès de la connaissance…, dans l'état actuel de la Science.**
- **L'expression à l'égard des animaux de laboratoire d'un respect sur leur caractère d'êtres sensibles… est concrétisée par l'adoption du principe des «3R», par la prise en compte du rapport préjudice aux animaux / bénéfice pour l'homme, par la généralisation des comités d'éthique et par le développement de diverses mesures de bien-traitance.**
- **La reconnaissance qu'en biologie en général… la démarche expérimentale utilise, sans a priori et de manière objective, l'ensemble des possibilités méthodologiques qu'elle a créées.**
- **La définition et la proposition d'un dialogue sociétal fondé sur la connaissance et le respect mutuel.**

note 10_ *Plus d'info : www.opal-association.org.*

note 11_ *Académie Vétérinaire de France : Commission « relations homme-animaux » ; Recherche scientifique et expérimentation animale. État de la question. Mai 2012. Une mise à jour de ce rapport a été réalisée en avril 2013.*

« PICASO ALTERNATIVES A MONTRÉ QUE SOCIÉTÉ CIVILE ET SCIENTIFIQUES TRAVAILLENT À DES ÉCHELLES DE TEMPS DIFFÉRENTES. L'ÉCOUTE, LES NOMBREUX ÉCHANGES, LES INFORMATIONS ET ACTIONS PARTAGÉES SONT FAVORABLES À LA CONSTRUCTION D'UN COLLECTIF, SANS POUR AUTANT PERDRE LA SPÉCIFICITÉ DE CHACUN. C'EST AUSSI UNE FORME DE RECONNAISSANCE DE L'EXPERTISE ASSOCIATIVE QUI POURRAIT PERMETTRE D'ENVISAGER DES PROGRAMMES DE RECHERCHE-ACTION SUR DES THÉMATIQUES SENSIBLES DANS L'OPINION »

»» et/ou de développement et d'innovation responsables. Les plateformes qui se mettent en place permettront l'association de partenaires publics et privés autour du partage de données à l'échelle nationale et européenne, en définissant une gouvernance transparente et ouverte à toutes les parties prenantes, à l'image de ce qui est proposé dans la stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens.

EN MATIÈRE D'ATTENTES SOCIÉTALES, QUELLES ÉVOLUTIONS À L'INERIS SUITE À PICASO ALTERNATIVES ?

Au-delà du sujet scientifique spécifiquement traité dans PICASO Alternatives, le retour d'expérience à en tirer pour l'Institut concerne de façon plus globale sa capacité à renforcer la dimension sociétale dans son expertise scientifique et technique et sa recherche. Les principaux constats sont les suivants :

- dans un environnement concurrentiel et mondialisé où tout est plus rapide, et avec la privatisation croissante de l'activité scientifique, l'inquiétude et la méfiance de la société au regard de la science et de la technologie s'accroît,
- les experts ne sont pas suffisamment sensibilisés à la dimension sociétale de leurs travaux,
- un besoin éthique et une attente de la société au regard de la capacité de prédiction de la science et de sa fiabilité sont identifiés.

Sur cette base, certaines pistes de réflexion pour renforcer la dimension sociétale à l'INERIS sont émises[12] :

- élargir les actions de dialogue et d'ouverture à la société à d'autres acteurs que les ONG et associations de consommateurs,
- favoriser les approches multidisciplinaires (multi-risques, multi-impacts) de la recherche, encourager la collaboration entre les sciences sociales et naturelles pour améliorer la méthode de travail, l'écoute mutuelle et l'éthique,
- expliquer au public organisé les implications et les limites inhérentes aux conclusions des recherches et expertises scientifiques pour favoriser l'ancrage scientifique,
- encourager une approche holistique d'anticipation des enjeux qui prenne en compte un éventail réaliste à un instant "t" de situations potentiellement à risque et d'incidences socio-économiques sur des sujets émergents,
- exploiter le potentiel prévisionnel de la science afin de répondre aux besoins sociaux, notamment sur les sujets émergents, tout en étant conscient des limites des prévisions scientifiques.

note 12_ *Certaines formulations sont inspirées des travaux de l'UNESCO, 2000. World Conference on Science. Science for the twenty first century : a new commitment. ISBN 1 903 598 001.*

annexes

26 ◆ ANNEXE 1
Les réseaux et la recherche

28 ◆ ANNEXE 2
Analyse simplifiée des avancées et des enjeux des méthodes alternatives en expérimentation animale

30 ◆ ANNEXE 3
Liens utiles

Il existe plusieurs alliances pour la recherche visant à coordonner les acteurs d'un domaine afin de concevoir des programmes thématiques fédérateurs dont AVIESAN (Alliance nationale pour les sciences de la vie et de la santé) et AllEnvi (Alliance nationale de recherche pour l'environnement). L'INERIS compte partager avec celles-ci son expertise dans le domaine des méthodes alternatives en expérimentation animale et des perturbateurs endocriniens.

LES RÉSEAUX ET LA RECHERCHE

FRANCOPA : PLATEFORME FRANÇAISE DÉDIÉE AU DÉVELOPPEMENT, À LA VALIDATION ET À LA DIFFUSION DE MÉTHODES ALTERNATIVES EN EXPÉRIMENTATION ANIMALE

FRANCOPA a été inaugurée le 16 novembre 2007 (sous la forme d'un Groupement d'intérêt scientifique – GIS « méthodes alternatives »). Dans un cadre d'évaluation du danger et du contrôle des produits de santé, des produits cosmétiques et des substances chimiques, elle rassemble des partenaires français ayant comme objectif commun de promouvoir les méthodes permettant de réduire la souffrance animale, de recourir à une méthode bio-informatique, à un test cellulaire en substitution d'un test sur animal ou de réduire le nombre d'animaux utilisés au cours de ce test. FRANCOPA est membre de la plateforme européenne ECOPA (European Consensus-Platform for Alternatives).

« FRANCOPA CRÉE LES CONDITIONS D'UNE PLUS FORTE ACCEPTATION DU RECOURS AUX MÉTHODES ALTERNATIVES »

Parmi les recommandations du rapport FRANCOPA[13] remis en 2010 à Madame la ministre de l'Enseignement

LES 14 PARTENAIRES DE FRANCOPA

Les partenaires sont des institutions gouvernementales, des instituts de recherche, des industriels et des organisations non gouvernementales pour le bien-être animal :

- **INERIS** (Institut national de l'environnement industriel et des risques), **membre fondateur.**
- **Ministère en charge de l'Écologie.**
- **ANSES** (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail).
- **ANSM** (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé).
- **CEA** (Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives).
- **CNRS** (Centre national de la recherche scientifique).
- **FEBEA** (Fédération des entreprises de la beauté).
- **INRA** (Institut national de la recherche agronomique).
- **INSERM** (Institut national de la santé et de la recherche médicale).
- **LEEM** (Les entreprises du médicament).
- **LFDA** (Fondation du droit animal, éthique et sciences).
- **OPAL** (Recherche expérimentale et protection de l'animal de laboratoire).
- **SPTC** (Société de pharmaco-toxicologie cellulaire).
- **UIC** (Union des industries chimiques).

+ D'INFO

www.francopa.fr

supérieur et de la Recherche, intitulé « État des lieux des méthodes alternatives dans le domaine de l'expérimentation animale en France », la recommandation 10 préconise de « créer un infocentre pour faire connaître les actions et partager les résultats entre les différents secteurs ». L'infocentre a été inauguré le 2 juillet 2012.
FRANCOPA organise régulièrement des colloques (dispense de l'expérimentation animale dans le contexte réglementaire, lecture croisée…).

ANTIOPES : UNE INFRASTRUCTURE NATIONALE DE RECHERCHE EN TOXICOLOGIE PRÉDICTIVE

L'infrastructure de recherche ANTIOPES a été développée dans le but de répondre aux défis du Plan national santé environnement. Sur la base de son réseau scientifique de partenaires, elle a pour objectifs de coupler les approches *in vitro*, *in silico* et *in vivo* et de regrouper des moyens français de recherche en toxicologie environnementale pour construire les outils de la toxicologie prédictive. ANTIOPES se structure autour de l'approche systémique. Plus précisément, cette approche se fonde sur la capacité à prédire, à partir d'un mécanisme cellulaire ou moléculaire, les effets sur l'organisme entier. Il s'agit donc de travailler sur le développement de biomarqueurs et de modèles aux différents niveaux du vivant.
Le réseau est actuellement constitué d'une vingtaine d'équipes sur toute la France appartenant à divers organismes de tutelles : l'INERIS, l'INSERM, le CEA, l'INRA, plusieurs universités (Paris Diderot, Université de Technologie de Compiègne - UTC, Institut Polytechnique Lasalle de Beauvais, Université Picardie Jules Verne - UPJV, Université de Marseille, Université de Metz) et des instances industrielles (CRITT CHIMIE PLASTURGIE).

LE PÔLE NATIONAL APPLICATIF EN TOXICOLOGIE ET ÉCOTOXICOLOGIE

Le pôle national applicatif en toxicologie a été créé par le ministère en charge de l'Écologie au sein de l'INERIS. Il s'organise autour de la Fondation universitaire de l'UTC, de l'Unité périnatalité et risques toxiques (PériTox) de l'UPJV, de l'Institut Lasalle Beauvais et du réseau ANTIOPES. Il a été soutenu en partie par un financement post-Grenelle destiné à augmenter les moyens humains en toxicologie et en éco toxicologie. L'une des principales finalités du Pôle est le développement de méthodes alternatives opérationnelles dans le domaine du risque environnemental, afin d'améliorer la capacité de prédiction des essais et de la modélisation en (éco-) toxicologie ainsi que l'investigation en biologie fondamentale et appliquée. Le pôle contribuera à l'extension et la montée en crédibilité des méthodes en développant et qualifiant de nouveaux outils prédictifs. L'animation du pôle est l'un des principaux enjeux de recherche du contrat d'objectifs 2011-2015 de l'INERIS.

Mise en culture d'algues vertes.

Les objectifs spécifiques :
- Étudier les expositions aux mélanges de substances et aux risques émergents.
- Améliorer une (éco-) toxicologie prédictive alternative aux expérimentations animales.
- Analyser le comportement physique des substances.
- Caractériser, mesurer et surveiller les effets des substances, notamment émergentes.

Les jalons, de 2011 à 2015 :
- Mise en œuvre opérationnelle de la nouvelle animalerie.
- Accueil des équipes extérieures pour le transfert des méthodes en toxicologie prédictive pour répondre aux attentes des industriels.
- Diffusion des premiers logiciels développés par la plateforme de modélisation.
- PREDIMOL[14].

note 13_ *Ce rapport a été actualisé le 30 novembre 2011 et amendé le 10 février 2012.*

note 14_ *Depuis 2007, dans un autre contexte que l'expérimentation animale, la Direction des Risques Accidentels de l'INERIS développe des modèles numériques basés sur la corrélation entre la structure moléculaire d'une substance chimique et ses propriétés physicochimiques dangereuses comme l'explosivité. Voisins des modèles développés en toxicologie qui relient la structure d'une molécule à son activité biologique (les QSARs), ils sont appelés QSPR (***Quantitative Structure-Property Relationship***). Ces modèles sont conçus pour pouvoir être utilisés dans un cadre réglementaire.*

+ D'INFO

www.ineris.fr/predimol

La cartographie proposée est une représentation simpliste d'une thématique extrêmement complexe, tant du point de vue scientifique que réglementaire et sociétal. Elle ne saurait en aucun cas refléter la richesse des développements et l'exhaustivité des applications en la matière. Son objet est de visualiser l'état des lieux actuel et les principaux axes de progrès à l'horizon 2020, par grands types d'effets et de méthodes.

ANALYSE SIMPLIFIÉE DES AVANCÉES ET DES ENJEUX DES MÉTHODES ALTERNATIVES EN EXPÉRIMENTATION ANIMALE

LES EFFETS

◆ **La toxicité systémique** (doses répétées, cancérogénicité – en particulier non génotoxique –, reprotoxicité) est aujourd'hui, avec la toxicité environnementale, le domaine le moins bien couvert par le recours aux méthodes alternatives. Les besoins de recherche sont importants et la substitution totale ne peut pas être envisagée à ce stade. Des logiques de criblage prédominent, à l'image de ce qui est développé en mutagénicité, domaine dans lequel la qualité des tests *in vitro*, certes existants, reste à améliorer afin de réduire le nombre de faux positifs qui implique un recours quasi-systématique (et réglementé) à l'*in vivo*. Les stratégies de tests intégrés (ITS) ayant fait l'objet d'un criblage préalable (à l'aide de QSAR, par exemple) et le « 2R-*in vivo* » (*in vivo* respectant les principes de Réduction/Raffinement) représentent des axes majeurs de progrès. Dans le domaine de l'écotoxicologie, pour les essais sur vertébrés, les avancées concernent principalement l'étude de modes d'action, en particulier le caractère perturbateur endocrinien des substances sur des lignées cellulaires de poisson ou sur des espèces transgéniques (poisson, amphibien).

LES SOURCES DE DONNÉES UTILISÉES POUR L'ANALYSE

◆ Sites internet du TSAR et de l'ECVAM (consultation août 2013).

◆ Tableau de synthèse AltTox (mis à jour en février 2013) sur la validation et l'acceptation réglementaire des méthodes alternatives et ITS.

◆ Rapport ECHA 2011 sur l'usage des méthodes alternatives dans le contexte de REACH.

◆ Rapport AXLR8 2012 sur les avancées de la recherche en matière de stratégies de tests alternatifs.

◆ Rapport EURL-ECVAM 2013 sur les avancées du développement, de la validation et de l'acceptation réglementaire des méthodes alternatives dans le contexte de la directive cosmétique. Tous les documents sont disponibles sur les sites internet des organismes.

◆ Rapport du GIS FRANCOPA 2010 sur l'état des lieux des méthodes alternatives dans le domaine de l'expérimentation animale en France (mis à jour en 2012).

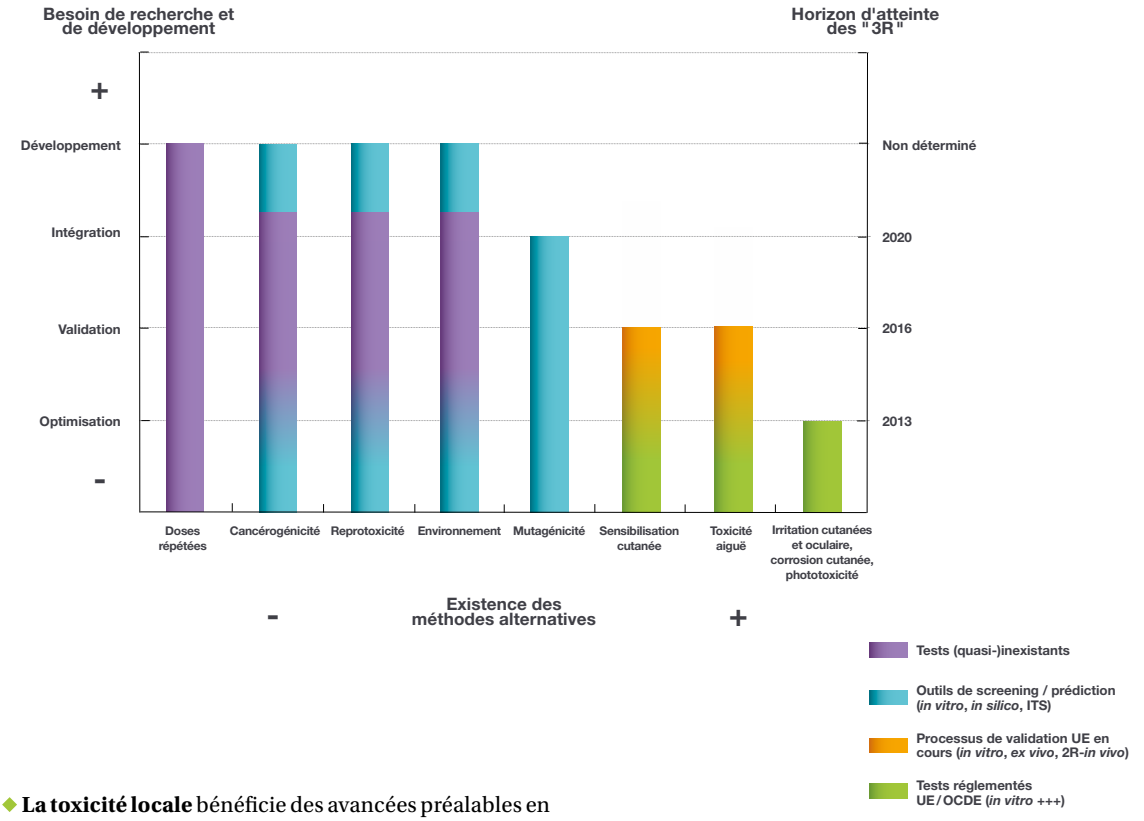


figure 7.
Cartographie simplifiée des avancées et des enjeux des méthodes alternatives en expérimentation animale pour l'évaluation des potentiels toxiques des substances chimiques.

◆ **La toxicité locale** bénéficie des avancées préalables en cosmétique : la corrosion et l'irritation cutanée, l'irritation oculaire et la phototoxicité sont des domaines déjà bien couverts par le recours aux tests *in vitro* (principe de Remplacement), qui peuvent encore être optimisés.
◆ **En situation intermédiaire**, on retrouve la toxicité aiguë et la sensibilisation cutanée, pour lesquelles des tests *in vitro* et des stratégies de réduction/raffinement (2R-*in vivo*) se développent. Le remplacement total des tests animaux pour l'étude de la sensibilisation cutanée peut être envisagé dans les prochaines années.

LES MÉTHODES

◆ **Les tests *in vitro*** sont actuellement les plus utilisés, ils sont une alternative classique en irritation oculaire ou cutanée. L'analyse de l'origine des données présentées lors de la première phase d'enregistrement dans REACH (décembre 2010), montre que la majorité des données est issue de tests *in vivo* classiques pour les autres types d'effets. Le recours aux QSAR représente quant à lui moins de 0,5 % des essais en toxicologie et moins de 4 % des essais en écotoxicologie. Les axes de progrès pour les méthodes de remplacement *in vitro* et *in silico* (ensemble des méthodes de prédiction) sont, pour les premières, le développement du génie tissulaire et des tests sur organes entiers reconstitués ; pour les secondes, l'amélioration de la mise à disposition et du partage de données de qualité, *via* les plateformes d'échanges ainsi qu'une meilleure connaissance des mécanismes d'action et événements moléculaires.
◆ **Les méthodes de réduction** comme l'*ex vivo* et les omics sont peu utilisées dans le panorama actuel. S'agissant des omics, les perspectives de recherche sur les signatures génomiques et les puces ADN sont importantes. Enfin, la toxicocinétique est un élément indispensable à la compréhension des mécanismes toxiques et à la prédiction des résultats *in vivo* à partir de l'*in vitro* par des modèles PBPK. Sous 5 à 7 ans, la toxicocinétique devrait être un facteur d'amélioration prépondérant des stratégies de tests intégrés (ITS). ▬

LIENS UTILES

ECOPA
European COnsensus-Platform for Alternatives
www.ecopa.eu

AltTox
Non-animal Methods for Toxicity Texting
www.alttox.org

ALTWEB
Alternatives to Animal Testing on the Web
http://altweb.jhsph.edu/

ASAT
Assuring Safety Without Animal Testing
www.asat-initiative.eu

AXLR8
Accelerating the Transition to a Toxicity Pathway-based Paradigm for Chemical Safety Assessment throught Internationally co-ordinated Research and Technology Development
www.axlr8.eu

CAAT
Johns Hopkins University - Center for Alternatives to Animal Testing
http://caat.jhsph.edu

EURL - ECVAM
European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing
http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam

EPAA
European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing
www.epaa.eu.com

EUROECOTOX
European Network for Alternatives Testing Strategies in Ecotoxicology
www.euroecotox.eu

EUSAAT
European Society for Alternatives to Animal testing
www.eusaat.org

FRAME
Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments
www.frame.org.uk

FRANCOPA
Plateforme nationale pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale
www.francopa.fr

InterNICHE
International Network for Humane Education
www.interniche.org

LFDA
La Fondation droit animal, éthique et sciences
www.fondation-droit-animal.org

IVTIP
In Vitro Testing Industrial Platform
www.ivtip.org

NC3Rs
UK National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research
www.nc3rs.org.uk

NKCA
National Knowledge Centre on Alternatives
www.nkca.nl/algemeen/menu/english

SPTC
Société de pharmaco-toxicologie cellulaire
http://sptc.free.fr

NORINA
Norwegian Inventory of Alternatives
http://oslovet.veths.no

TSAR
Tracking System for Alternative test methods Review, Validation and Approval in the Context of EU Regulations on Chemicals
http://tsar.jrc.ec.europa.eu

IVTS
In Vitro Toxicology Society
www.ivts.org.uk

OCDE
Organisation de coopération et de développement économiques
www.oecd.org

Ce document est imprimé sur un papier 100 % PEFC blanchi sans chlore et issu de forêts gérées durablement.
Le label Imprim'Vert garantit des travaux d'impression propres et respectueux de l'environnement.

INERIS Références décembre 2013
Méthodes alternatives
Parc technologique Alata - B.P. 2 - 60550 Verneuil-en-Halatte
tél. : 03 44 55 66 77 - fax : 03 44 55 66 99
e-mail : ineris@ineris.fr - www.ineris.fr

A contribué à ce dossier :
La Direction des Risques Chroniques, en particulier Eric Thybaud

Rédaction :
Céline Boudet - INERIS

Conception & réalisation graphique :
Efil 02 47 47 03 20 - www.efil.fr

Impression :
Gibert et Clarey (Chambray-lès-Tours)

Crédits photographiques :
INERIS, Michel Chanterelle

À PROPOS DE L'INERIS

L'Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS) a pour mission de contribuer à la prévention des risques que les activités économiques font peser sur la santé, la sécurité des personnes et des biens, et sur l'environnement. Il mène des programmes de recherche visant à mieux comprendre les phénomènes susceptibles de conduire aux situations de risques ou d'atteintes à l'environnement et à la santé, et à développer sa capacité d'expertise en matière de prévention. Ses compétences scientifiques et techniques sont mises à la disposition des pouvoirs publics, des entreprises et des collectivités locales afin de les aider à prendre les décisions les plus appropriées à une amélioration de la sécurité environnementale.

Créé en 1990, l'INERIS est un établissement public à caractère industriel et commercial, placé sous la tutelle du ministère chargé de l'écologie, du développement durable et de l'énergie. Il emploie 587 personnes, basées principalement à Verneuil-en-Halatte, dans l'Oise.

Parc Technologique Alata - B.P.2
60550 Verneuil-en-Halatte
Tél. : 03 44 55 66 77
Fax : 03 44 55 66 99
e-mail : ineris@ineris.fr
www.ineris.fr

INERIS
maîtriser le risque pour un développement durable